

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3420925 A1**

⑤1 Int. Cl. 4:
G01 N 33/68
C 12 Q 1/00
C 12 N 15/00
C 12 P 19/34

②1 Aktenzeichen: P 34 20 925.5
②2 Anmeldetag: 5. 6. 84
④3 Offenlegungstag: 5. 12. 85

DE 3420925 A1

⑦1 Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

⑦2 Erfinder:
Wolf, Hans, Prof. Dr.Dr., 8130 Starnberg, DE

⑤4 Verfahren und Reagenz zum Nachweis einer Nukleinsäure-Sequenz

Gegenstand der Anmeldung ist ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure-Sequenz durch Hybridisierung mit einer Indikatorsubstanz, die eine zur gesuchten Nukleinsäure-Sequenz 1 komplementäre Nukleinsäure-Sequenz 2 sowie eine oder mehrere Erkennungssequenzen 3 enthält. Das so gewonnene Hybridisierungsprodukt wird mit einer zweiten Indikatorsubstanz, die eine zur Sequenz 3 komplementäre-Sequenz 4 sowie eine Markierungsgruppe aufweist, umgesetzt und die Markierungsgruppe im Hybridisierungsprodukt wird anschließend nachgewiesen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenz zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, das eine erste Indikatorsubstanz mit einer zur gesuchten Nukleinsäure-Sequenz 1 komplementären Nukleinsäure-Sequenz 2 und einer oder mehreren Erkennungssequenzen 3, eine zweite Indikatorsubstanz mit einer zur Sequenz 3 komplementären Nukleinsäure-Sequenz 4 und einer Markierungsgruppe sowie ein Nachweissystem für diese Markierungsgruppe enthält.

DE 3420925 A1



Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure-Sequenz durch Hybridisierung mit einer Indikatorsubstanz, die eine zur gesuchten Nukleinsäure-Sequenz komplementäre Nukleinsäure-Sequenz enthält, und Nachweis des Hybridisierungsprodukte mit Hilfe eines Markierungsmittels, dadurch gekennzeichnet, daß die nachzuweisende Nukleinsäure-Sequenz (Sequenz 1) mit einer ersten Indikatorsubstanz, die eine zur Sequenz 1 komplementäre Nukleinsäure-Sequenz (Sequenz 2) sowie eine oder mehrere Erkennungssequenzen (Sequenz 3) enthält, hybridisiert, das so gewonnene Hybridisierungsprodukt mit einer zweiten Indikatorsubstanz, die eine zur Sequenz 3 komplementären Nukleinsäure-Sequenz (Sequenz 4) sowie eine Markierungsgruppe aufweist, umgesetzt und die Markierungsgruppe im Hybridisierungsprodukt nachgewiesen wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Indikatorsubstanz mehrere unterschiedliche Erkennungssequenzen 3 trägt und ein Gemisch von zweiten Indikatorsubstanzen eingesetzt wird, die sich durch verschiedene, zu den unterschiedlichen Sequenzen 3 jeweils komplementäre Sequenzen 4 unterscheiden.
3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch von zweiten Indikatorsubstanzen mit unterschiedlichen Sequenzen 4 eingesetzt wird, die zu Teilbereichen der Erkennungssequenz 3 komplementär sind.



4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Markierungsgruppe Radioisotope-tragende Gruppen, Enzyme oder Licht-emittierende Gruppen verwendet werden.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Markierungsgruppe ein Hapten eingesetzt wird und der Nachweis durch Umsetzen mit einem markierten Antikörper und Meßen der Markierung erfolgt.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkennungssequenz aus einer Oligo- oder Polynukleotid-Sequenz mit mindestens 10 Nukleotid-Einheiten besteht.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Sequenz 3 die Sequenz eines Klonierungsvektors verwendet wird.
8. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Sequenz 3 eine synthetische Nukleinsäure-Sequenz darstellt, die in dem Untersuchungsmaterial nicht vorkommt.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz 2 in Einzelstrangphagen kloniert ist.
10. Verfahren gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Indikatorsubstanz teilweise zur Sequenz 3 komplementäre und teilweise mit Sequenz 3 identisch Sequenzen 4 enthält.

X

11. Abwandlung eines Verfahrens gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als zweite Indikatorsubstanz eine nichtmarkierte Substanz mit der Nukleinsäure-Sequenz 4 und einer oder mehreren weiteren Erkennungssequenzen 5 eingesetzt und das Produkt der zweiten Hybridisierungsreaktion in einem dritten Hybridisierungsschritt mit einer dritten Indikatorsubstanz, die eine zur Sequenz 5 komplementäre Sequenz 6 und die Markierungsgruppe trägt, hybridisiert wird.
12. Reagenz zur Durchführung des Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 - 11, dadurch gekennzeichnet, daß es eine erste Indikatorsubstanz mit einer zur gesuchten Nukleinsäure-Sequenz 1 komplementären Nukleinsäure-Sequenz 2 und einer oder mehreren Erkennungssequenzen 3, eine zweite Indikatorsubstanz mit einer zur Sequenz 3 komplementären Nukleinsäure-Sequenz 4 und einer Markierungsgruppe sowie ein Nachweissystem für diese Markierungsgruppe enthält.
13. Reagenz gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß als Markierungsgruppe Radioisotope-tragende Gruppen, Enzyme oder Licht-emittierende Gruppen verwendet werden.
14. Reagenz gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß als Markierungsgruppe ein Hapten verwendet wird und das Nachweissystem aus einem markierten Antikörper und einem Reagenz zum Nachweis der Markierung besteht.
15. Reagenz gemäß einem der Ansprüche 12 - 14, dadurch gekennzeichnet, daß als Markierungsgruppe bzw. zur Markierung des Antikörpers ein Enzym verwendet wird und das Nachweissystem ein Reagenz zum Nachweis dieses Enzym enthält.



16. Reagenz gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß als Markierungsenzym Peroxidase oder β -Galactosidase verwendet wird und das Nachweissystem ein chromogenes Substrat für diese Enzyme enthält.

Verfahren und Reagenz zum Nachweis einer Nukleinsäure-
Sequenz

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure-Sequenz und ein für dieses Verfahren geeignetes Reagenz.

Nukleinsäure-Sequenzen werden üblicherweise durch Hybridisierung mit einer komplementären Nukleinsäure-Sequenz nachgewiesen, die mit einer nachweisbaren Gruppe markiert ist. Bisher erfolgt diese Markierung durch Einführung von Radioisotopen-tragenden Gruppen. Da das Arbeiten mit radioaktiven Substanzen und der Nachweis von Radioisotopen mit erheblichen Nachteilen (Sicherheitsvorkehrungen, apparativer Aufwand) verbunden ist, wurde verschiedentlich versucht, andere Markierungsmittel für den Hybridisierungstest zu verwenden.

Aus der deutschen Offenlegungsschrift 29 15 082 ist ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäure-Sequenzen bekannt, bei dem diese mit einem Indikator hybridisiert wird, der eine komplementäre Nukleinsäure enthält und der durch Bindung an ein Enzym vor oder nach der Hybridisierungsreaktion chemisch modifiziert ist. Der Nachweis des Hybridisierungsproduktes erfolgt schließlich durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Markerenzym.

In der europäischen Offenlegungsschrift 00 70 687 wird schließlich ein Nukleinsäure-Nachweisverfahren beschrieben, bei dem Licht-emittierende Reagenzien als nachzuweisende Gruppen eingesetzt werden.



Allen diesen bisher bekannten Verfahren gemeinsam ist, daß zur Hybridisierung ein entsprechend markiertes Nukleinsäure-Derivat eingesetzt werden muß, das eine charakteristische, zu der nachzuweisenden Nukleinsäure-Sequenz komplementäre Nukleinsäure-Sequenz enthält.

Die Einführung der Markierungsgruppe ist im allgemeinen sehr aufwendig, so daß die markierten Nucleinsäure-Derivate teure Produkte darstellen, die bei der Hybridisierungsreaktion in möglichst niedriger Konzentration eingesetzt werden. Darüberhinaus ist es bei dem Verfahren gemäß dem Stand der Technik erforderlich, für jede nachzuweisende Nukleinsäure-Sequenz das entsprechende markierte Derivat mit komplementärer Nukleinsäure-Sequenz herzustellen.

Es bestand daher weiterhin der Bedarf nach einem Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäure-Sequenzen, das mit leichter herstellbaren und letztlich billigeren Reagenzien durchführbar ist. Aufgabe war es, ein solches Verfahren bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure-Sequenz durch Hybridisierung mit einer Indikatorsubstanz, die eine zur gesuchten Nukleinsäure-Sequenz komplementäre Nukleinsäure-Sequenz enthält, und Nachweis des Hybridisierungsproduktes mit Hilfe eines Markierungsmittels, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die nachzuweisende Nukleinsäure-Sequenz (Sequenz 1) mit einer ersten Indikatorsubstanz, die eine zur Sequenz 1 komplementäre Nukleinsäure-Sequenz (Sequenz 2) sowie eine oder mehrere Erkennungssequenzen (Sequenz 3), enthält, hybridisiert, das so gewonnene



Hybridisierungsprodukt mit einer zweiten Indikatorsubstanz, die eine zur Sequenz 3 komplementäre Nukleinsäure-Sequenz (Sequenz 4) sowie eine Markierungsgruppe aufweist, umgesetzt und die Markierungsgruppe im Hybridisierungsprodukt nachgewiesen wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat gegenüber den bisher bekannten Methoden den Vorteil, daß die nachzuweisende Sequenz 1 zunächst mit einer nicht markierten Indikatorsubstanz hybridisiert werden kann, die leicht und in großen Mengen billig hergestellt werden kann. Diese erste Indikatorsubstanz kann somit in dem ersten Hybridisierungsschritt in großem Überschuß eingesetzt werden. Dadurch wird die Hybridisierung zwischen Sequenz 1 und komplementärer Sequenz 2 begünstigt, da durch die mögliche hohe Konzentration an erster Indikatorsubstanz eine Geschwindigkeitssteigerung der Hybridisierungsreaktion bewirkt und darüberhinaus das Gleichgewicht mehr auf die Seite des Hybridisierungsproduktes verschoben wird.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß die zum Nachweis verschiedener Nukleinsäure-Sequenzen 1 benötigten ersten Indikatorsubstanzen neben der jeweils komplementären Sequenz 2 die stets gleiche Sequenz 3 tragen können, so daß für den zweiten Hybridisierungsschritt zur Erkennung der Sequenz 3 stets die gleiche zweite Indikatorsubstanz mit der komplementären Sequenz 4 eingesetzt werden kann. Nur diese zweite, universell einsetzbare Indikatorsubstanz muß markiert werden.



Die erste Indikatorsubstanz kann mehrere identische Erkennungssequenzen 3 enthalten. Die zweite Indikatorsubstanz mit der komplementären Sequenz 4 wird dann in entsprechend erhöhter Konzentration eingesetzt. Dadurch wird ein Verstärkungseffekt und damit eine Empfindlichkeitssteigerung erreicht, da für jede nachzuweisende Sequenz 1 eine der Zahl der Erkennungssequenzen 3 entsprechende Anzahl von Markierungsgruppen zur Erzeugung eines Meßsignals zur Verfügung stehen.

Die erste Indikatorsubstanz kann aber auch mehrere unterschiedliche Erkennungssequenzen 3 tragen. Der zweite Hybridisierungsschritt wird dann mit einem Gemisch von zweiten Indikatorsubstanzen durchgeführt, die sich durch verschiedene, zu den unterschiedlichen Sequenzen 3 jeweils komplementäre Sequenzen 4 unterscheiden. Auch hierdurch wird eine entsprechende Verstärkung des Meßsignals bewirkt. Ein Sonderfall dieser Ausführungsform stellt ein Verfahren dar, bei dem im zweiten Hybridisierungsschritt ein Gemisch von zweiten Indikatorsubstanzen mit unterschiedlichen Sequenzen 4 eingesetzt wird, die zu Teilbereichen der Erkennungssequenz 3 komplementär sind.

Zur Markierung können im Prinzip alle üblichen Markierungsmittel verwendet werden. Als besonders vorteilhaft hat sich beispielsweise erwiesen, in die zweite Indikatorsubstanz Radioisotope tragende Gruppen, Enzyme oder auch Licht-emittierende Gruppen einzuführen. Hierfür stehen dem Fachmann zahlreiche Methoden zur Verfügung. Es kann aber auch mit anderen, nachweisbaren Substituenten, z. B. Haptenen, wie Digoxin, Biotin usw., markiert werden, die ihrerseits wieder durch Umsetzen mit den entsprechenden Reagenzien, z. B. markierten



Antikörpern nach bekannten Methoden nachgewiesen werden können. Besonders bevorzugt ist die Markierung mit Hilfe eines Radioisotops oder eines Enzyms. Hierzu wird die zweite Indikatorsubstanz in üblicher Weise mit der das Radioisotop tragenden Gruppe bzw. mit dem Markerenzym, vorzugsweise Peroxidase oder β -Galactosidase, gegebenenfalls über einen Spacer verknüpft.

Der Nachweis der Markierungsgruppe in dem Hybridisierungsprodukt erfolgt nach hierfür gängigen Methoden. Werden Radioisotope eingesetzt, so wird die Radioaktivität des Endproduktes in üblicher Weise gemessen. Erfolgt die Markierung beispielsweise mit einem Enzym, so kann das Hybridisierungsprodukt vorteilhaft mit einem spezifischen chromogenen Substrat nachgewiesen werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich Nukleinsäuren oder Teile von Nukleinsäuren von Krankheitserregern, beispielsweise Viren oder Bakterien, nachweisen. Stellvertretend für zahlreiche mögliche Nukleinsäure-Sequenzen 1 seien hier beispielsweise aufgeführt: Genome von Tumorzellen aus Gesamt-Nukleinsäure von Tumoren, Plasmide oder episomale DNS, bestimmte Gene oder Segmente eines Genoms auf DNS-oder RNS-Ebene, die von besonderem Interesse sind, weil sie beispielsweise mutiert oder in geänderter Häufigkeit transkribiert sind. Die nachzuweisenden Stoffe können in den verschiedensten Untersuchungsmaterialien, beispielsweise Serum, Urin-Sediment oder Extrakten, z. B. aus Pflanzenteilen, enthalten sein.



Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird das DNS oder RNS-haltige Material, soweit notwendig, vorbehandelt. Hierbei werden das Nachweisverfahren störende Teile, beispielsweise die Proteinhülle von Viruspartikeln, zerstört oder/und abgetrennt. Hierzu kann das Material beispielsweise mit einem Enzym behandelt werden, das die nachzuweisenden Teile auf- bzw. abtrennt. Die eventuell erforderliche Abtrennung von störenden Teilen oder Bruchstücken kann beispielsweise mit Hilfe gelelektrophoretischer Trennverfahren oder durch Phasentrennverfahren erreicht werden. Liegt das Untersuchungsmaterial in Form eines Doppelstranges vor, so ist es erforderlich, mindestens den die nachzuweisende Sequenz 1 tragenden Teil in Einzelstränge zu trennen. Hierzu sind verschiedene Verfahren bekannt. Üblicherweise wird hierzu die Probe erhitzt und anschließend wieder abgeschreckt.

Vor der eigentlichen Hybridisierungsreaktion wird die Nukleinsäure mit der Sequenz 1 vorzugsweise an einen festen Träger gebunden. Hierzu eignet sich besonders Nitrozellulose oder Membranfilter auf Nylonbasis. Die Nukleinsäure kann auch kovalent an chemisch aktivierte Träger, bevorzugt an Membranen, fixiert werden. Nach der Fixierung werden auf dem Träger verbleibende Bindungsstellen für Nukleinsäuren durch Inkubation mit geeigneten Substanzen abgesättigt. Für diese Vorhybridisierung geeignete Substanzen können nicht verwandte Nukleinsäuren, Detergentien, Polyanionen oder jede beliebige andere Substanz sein, welche die Fähigkeit besitzt, unspezifische Bindungen an dem Träger abzusättigen.



Die eigentliche Hybridisierungsreaktion zwischen der Nukleinsäure-Sequenz 1 und der ersten Indikatorsubstanz erfolgt nach bekannten Methoden. Um eine Hybridbildung zu favorisieren, wird letztere im Überschuß inkubiert. Dies ist möglich, da die Hybridisierungsprobe mit Sequenz 2 nicht markiert werden muß und daher in großen Mengen hergestellt werden kann.

Die Sequenz 2 ist stets komplementär zu Sequenz 1 und kann RNS oder direkt isolierte oder klonierte DNS sein. Möglich ist auch, eine Mischung von komplementären Strängen, wie sie aus doppelsträngigen Proben erhalten werden, einzusetzen. Sequenz 2 ist mit Sequenz 3 derart verbunden, daß sie unter den Bedingungen der Hybridisierungsreaktion nicht voneinander getrennt werden. Besonders bevorzugt ist eine fest kovalente Verknüpfung.

Die Erkennungssequenz 3 besteht aus einer Oligo- oder Polynukleotid-Sequenz. Die Zahl der Nukleotid-Einheiten ist dabei mindestens so groß zu wählen, daß eine stabile Hybridisierung erreicht wird. Im allgemeinen besteht die Sequenz 3 aus mindestens zehn Nukleotid-Einheiten, zweckmäßigerweise werden jedoch Sequenzen aus mindestens zwanzig Nukleotid-Einheiten verwendet. Besonders vorteilhaft ist eine Erkennungssequenz aus einem längeren Heteropolymer, beispielsweise die Sequenz eines Klonierungsvektors oder eine zusätzlich eingebrachte, synthetische Nukleinsäure-Sequenz, die im Untersuchungsmaterial nicht vorkommt.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Sequenz 2 in eine Trägersubstanz eingebaut, die an anderer Stelle auch die Sequenz 3 enthält. Als solche Trägersubstanzen sind insbesondere Einzelstrangphagen geeignet, beispielsweise M13 oder fd, in die die Sequenz 2 kloniert wird. Es können



auch doppelsträngige Plasmide verwendet werden. Jede beliebige Sequenz 2, die zum Nachweis einer bestimmten Nukleinsäure-Sequenz 1 erforderlich ist, kann mit Hilfe des üblichen Klonierungsverfahrens in den gleichen Ausgangsstamm von Einzelstrangphagen eingebaut werden. Als Erkennungssequenz 3 dient dann jeweils eine identische Nukleinsäure-Region auf diesem Einzelstrangphagen.

Nach der Haupt-Hybridisierungsreaktion wird der Überschuß an Hybridisierungsprobe mit den Sequenzen 2 und 3 aus dem Medium entfernt. Dabei wird unter Bedingungen gearbeitet, die die Hybride bestehen lassen. Je nach gewünschter Spezifität wird bei Temperaturen von 5 bis 20° unter dem Schmelzpunkt der Hybride gewaschen. Besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, die Temperatur ca. 15° unter dem Schmelzpunkt zu wählen. Je näher die Temperatur am Schmelzpunkt des Hybridisierungsproduktes gewählt wird, desto mehr Basenpaare sind erforderlich, um eine stabile Hybridisierung zu erreichen. Je mehr Nukleotide zur Bildung von Basenpaaren herangezogen werden, desto spezifischer ist die eigentliche Hybridisierungsreaktion.

Der Nachweis der Erkennungssequenz 3 wird mit einer zweiten Hybridisierungsreaktion eingeleitet, bei der die Sequenz 3 mit einer Nukleinsäure-Sequenz 4 hybridisiert wird. Letztere wird von einer zweiten Indikatorsubstanz bereitgestellt, die auch die Markierungsgruppe trägt. Die zweite Indikatorsubstanz kann eine zur Sequenz 3 vollständig komplementäre Sequenz 4 aufweisen; besser ist es jedoch, wenn sie nur teilweise komplementär und teilweise identische Sequenzen enthält. Ein derartiges Gemisch erhält man beispielsweise, wenn zur Gewinnung von Sequenzen 4 tragende Indikatorsubstanzen von doppelsträngigen Materialien ausgeht, diese in Einzelstränge auftrennt, diese Einzelstränge jedoch in dem



Gemisch beläßt und als Gemisch weiterverarbeitet. Vor allem wenn die Nachweissequenzen (z. B. in Einzelstrang gespaltene replikative Formen von M13) relativ lang sind, bildet sich über den die Erkennungssequenz 3 tragenden Stellen eine empfindlichkeitssteigernde Netzwerkstruktur von Hybriden mit starker Signalkonzentration. Diese Netzwerkstruktur entsteht dadurch, daß Sequenz 4 nur teilweise mit Sequenz 3 der ersten Indikatorsubstanz und teilweise mit entsprechenden Teilen von mit Sequenz 3 identischen Sequenzen aus dem Gemisch der zweiten Indikatorsubstanzen hybridisiert. Die nicht abgesättigten Basen der zuletzt genannten Sequenz 3 können nun ihrerseits mit komplementären Teilen einer weiteren Sequenz 4 reagieren usw. So entsteht durch ständige überlappende Hybridisierung ein Netzwerk, das für jede nachzuweisende Sequenz mehrere Markierungsgruppen trägt.

Markierte, die Sequenz 4 enthaltenden Materialien sind universal einzusetzen, wenn zum Nachweis der verschiedenen Nukleinsäure-Sequenzen 1 Hybridisierungsproben eingesetzt werden, die sich zwar hinsichtlich der spezifischen zu Sequenz 1 komplementären Sequenz 2 unterscheiden, die aber stets die identische Erkennungssequenz 3 aufweisen. Dies macht das erfindungsgemäße Verfahren äußerst praktikabel. Einmal ist nur ein spezifisches Nachweisreagenz für die verschiedenen Nachweistests zu markieren; zum anderen ist nur dieses eine markierte Nachweismaterial zu bevorraten. Als spezifische Reagenzien müssen nur noch die Hybridisierungsproben mit Sequenz 2 und 3 eingesetzt werden. Diese müssen nicht mit einer Markierung versehen sein. Dadurch sind diese Substanzen leicht herzustellen und können in großen Mengen zur Verfügung gestellt werden.

Die Reaktion zwischen der Sequenz 3 und der Sequenz 4 wird ebenfalls unter üblichen Hybridisierungsbedingungen durchgeführt. Es ist lediglich darauf zu achten, daß die



im ersten Hybridisierungsschritt zwischen Sequenz 1 und Sequenz 2 gebildeten Hybride nicht destabilisiert werden. Hierzu genügt es im allgemeinen bei Temperaturen von 5 - 50° unter dem Schmelzpunkt der aus Sequenz 1 und Sequenz 2 gebildeten Hybride zu arbeiten. Vorzugsweise wird eine Temperatur gewählt, die ca. 5° unter der Temperatur liegt, bei der die Hybridisierung zwischen Sequenz 1 und Sequenz 3 durchgeführt worden ist.

In Abwandlung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann es zweckmäßig sein, als zweite Indikatorsubstanz noch einmal eine nicht markierte Substanz mit der Nukleinsäure-Sequenz 4 und einer oder mehreren weiteren Erkennungssequenzen 5 einzusetzen und das Produkt der zweiten Hybridisierungsreaktion in einem dritten Hybridisierungsschritt mit einer dritten Indikatorsubstanz, die eine zur Sequenz 5 komplementäre Sequenz 6 und die Markierungsgruppe trägt, zu hybridisieren. Diese Vorgehensweise empfiehlt sich vor allem dann, wenn die zweite Indikatorsubstanz schlecht zu markieren ist, wie dies zum Beispiel bei der katalytischen Markierung von doppelsträngiger DNS mit Jod vorkommen kann.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagens zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Dieses enthält eine erste Indikatorsubstanz mit einer zur gesuchten Nukleinsäure-Sequenz 1 komplementären Nukleinsäure-Sequenz 2 und einer oder mehreren Erkennungssequenzen 3, eine zweite Indikatorsubstanz mit einer zur Sequenz 3 komplementären Nukleinsäure-Sequenz 4 und einer Markierungsgruppe sowie ein Nachweis-system für diese Markierungsgruppe.

Für das Reagens gelten die obigen Ausführungen bezüglich des Verfahrens in entsprechender Weise.

Die Erfindung wird durch das folgende Beispiel näher erläutert:

X

Beispiel 1

Ein Nitrozellulose-Filterblatt (10 x 10 cm) wird 2 Minuten in 2 x SSC (SSC = 0,015 M Trinatrium-citrat + 0,15 M Natriumchlorid) vorgetränkt. Jeder Plot wird mit 25 ml 6 x SSC, 0,5 % SDS (SDS = Natrium-Dodecylsulfat), 100 µg Kalbsthymus-DNS/ml (10 Minuten auf 100° C vorerhitzt), 5 x Denhardt sol. (1 % Ficoll, 1 % Polyvinylpyrrolidon, 1 % Rinderserum-Albumin) in einem Plastikbeutel eingeschweißt und 3 Stunden bei 68° C im Wasserbad inkubiert.

Von jeder Plot-Tasche werden 17,5 ml Lösung entfernt, zu den verbleibenden 7,5 ml werden 185 µl 0.4 M EDTA zugegeben. Dazu kommt einzelsträngige M13 DNA mit einem Insert von 300 Basenpaaren Epstein-Barr-Virus DNS (10 Minuten bei 100° C erhitzt, in Eis abgeschreckt). Pro Plot werden 1 µg = 58 µl zugegeben. Die Hybridisierung erfolgt über 16 Stunden bei 68° C im Wasserbad.

Nach erfolgter Hybridisierung wird 5 Minuten in 2 x SSC, 0,5 % SDS bei Raumtemperatur und anschließend 2 x 20 Minuten mit 0,1 x SSC, 0,5 % SDS bei 68° C gewaschen.

Die Filter werden feucht weiter verarbeitet. Die Hybridisierung erfolgt mit nictranslatierter Probe p³² markierter M13 mp 8 DNS (doppelsträngige replikative Form des Bakteriophagen ohne Insertion). Die Filter werden pro Plot mit 7,5 ml Hybridisierungslösung wie in Schritt 3 inkubiert. Dazu kommen 10⁷ cpm (0,1 µg) der p³² markierten Probe, die vorher 10 Minuten bei 100° C denaturiert und in Eis abgeschreckt worden ist. Auch hier erfolgt die Inkubation über 16 Stunden. Die Temperatur wird bei 63° C im Wasserbad gehalten. Anschließend wird wieder 5 Minuten in 2 x SSC, 0,5 % SDS bei Raumtemperatur und 2 x 20 Minuten mit 0,1 x SSC, 0,5 % SDS bei 63° C gewaschen.

Der Nachweis des Hybridisierungsproduktes erfolgt durch Autoradiographie.

